


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 47/48	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/33880 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Juni 2000 (15.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03924 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Dezember 1999 (03.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 56 052.4 4. Dezember 1998 (04.12.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (DE/DE); Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖHR, Achim (DE/DE); Hans-Thoma-Strasse 5, D-69102 Heidelberg (DE). SCHWAB, Manfred (DE/DE); Mittlerer Rainweg 17-1d, D-69118 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: CONJUGATE USED FOR ENRICHING IN NEURONAL CELLS (54) Bezeichnung: KONJUGAT ZUR ANREICHERUNG IN NEURONALEN ZELLEN (57) Abstract <p>The invention relates to a conjugate for introducing active substances into neuronal cells, whereby the conjugate comprises the heavy chain of a toxin of the genus Clostridium and has at least one active substance, whereby the light chain of the toxin is absent. The invention also relates to a method for producing a conjugate of this type, to a kit and to the use of said conjugate.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat zur Einführung von Wirkstoffen in neuronale Zellen, wobei das Konjugat die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium und mindestens einen Wirkstoff umfaßt, wobei die leichte Kette des Toxins abwesend ist. Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Konjugats, einen Kit und die Verwendung des Konjugats.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	NL	Niederlande	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NO	Norwegen	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NZ	Neuseeland	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	PL	Polen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	PT	Portugal	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	RO	Rumänien		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	RU	Russische Föderation		
CN	China	KZ	Kasachstan	SD	Sudan		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	SE	Schweden		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SG	Singapur		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka				
DK	Dänemark	LR	Liberia				
EE	Estland						

Konjugat zur Anreicherung in neuronalen Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat zur Anreicherung in neuronalen Zellen, ein Verfahren zur Herstellung des Konjugats, einen Kit sowie die Verwendung dieser Gegenstände.

Es gibt verschiedenste Krankheiten, die Zellen des zentralen und/oder peripheren Nervensystems betreffen. Beispielsweise seien Morbus Parkinson, Alzheimer Krankheit, Schlaganfall, Hirntumore (z.B. Gliome, Medulloblastome, Astrozytome) oder Neuroblastome, genannt. Das Neuroblastom macht etwa 8-10% aller Krebserkrankungen bei Kindern aus und stellt den häufigsten extrakraniellen soliden Tumor bei Kindern dar. Das Neuroblastom entsteht aus neuroektodermalen Zellen der Neuralleiste. Diese Zellen wandern während der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste aus und bilden das sympathische Nervensystem und das Nebennierenmark. Gesichert gilt inzwischen, daß es bei etwa 30% der höher-malignen Neuroblastomen zu einer Amplifikation von MYC N kommt, wobei die Menge der Amplifikation von MYC N mit der Aggressivität des Tumorwachstums korreliert ist. Insgesamt ist für alle Neuroblastome festzustellen, daß diese durch ein komplexes Krankheitsbild und einen heterogenen Krankheitsverlauf charakterisiert sind. Während es bei einigen Patienten zur spontanen Regression des Tumors kommt, schreitet die Krankheit bei ungefähr der Hälfte der Patienten trotz intensiver Therapie fort. Auch bei Hirntumoren ist die Therapie schwierig. Dies liegt insbesondere daran, daß die meisten Medikamente bestimmte Zellschranken, wie die Blut-Hirn-Schranke, nicht passieren können und überhaupt nicht an den gewünschten Wirkort kommen. Auch radiologische Behandlungen sind lange nicht so erfolgreich wie wünschenswert. Hier wäre eine medikamentöse Vorbehandlung der Tumoren zur Photosensibilisierung sicher dem Erfolg der nachträglichen Strahlenbehandlung zuträglich (photodynamische Therapie). Aber auch

diese scheitert daran, daß keine Wege bereitstehen, wie die Mittel in die erkrankten Zellen gelangen. Die vorstehend aufgezeigte Problematik bei Neuroblastomen und Hirntumoren besteht generell für alle Erkrankungen des Nervensystems, da auch bei anderen Erkrankungen als Krebserkrankungen die therapeutischen und diagnostischen Wirkstoffe nicht effizient in Nervenzellen gelangen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht nun darin, ein Mittel bereitzustellen, mit dem unterschiedlichste Substanzen bzw. Wirkstoffe in neuronale Zellen eingeführt werden können.

Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

Von den Erfindern wurde herausgefunden, daß mit einem Konjugat, das die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium unterschiedlichste Substanzen bzw. Wirkstoffe mit therapeutischer oder diagnostischer Wirkung in neuronale Zellen transportiert werden können. Die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium vermittelt den Wirkstoffen die gewünschte Zellpermeabilität für neuronale Zellen. Erfindungsgemäß sollen unter der "schweren Kette eines Toxins der Gattung Clostridium" auch Fragmente oder Modifikationen (z.B. Austausche, Inversionen, Deletionen oder Insertionen) zu verstehen sein, die aber weiterhin Transporteigenschaften in neuronale Zellen aufweisen. Unter einem "Toxin der Gattung Clostridium" sind beispielsweise das Tetanus-Toxin, Botulinus-Toxin sowie seine Serotypen (A-G) dieser zu verstehen. Dabei ist der primäre Wirkort von Tetanus-Toxin das zentrale Nervensystem und von Botulinus-Toxin das periphere Nervensystem.

Mit Zellpermeabilität wird hier die Eigenschaft von Substanzen bzw. Wirkstoffen bezeichnet, in neuronale Zellen einzudringen. Diese Eigenschaft findet sich naturgegeben allerdings wie bereits oben ausgeführt nur bei wenigen Substanzen. Die meisten Substanzen benötigen Hilfsmittel bzw. Verfahren, um in

Zellen einzudringen. Beispiele hierfür sind Mikroinjektion, Elektroporation, Assoziation mit kationischen Lipiden, Liposomenbildung, Rezeptor-vermittelte Endocytose und Virusinfektion. Diese Hilfsmittel bzw. Verfahren weisen jedoch große Nachteile auf. Insbesondere sind sie teuer, erfordern komplexe Versuchsanordnungen und sind nur begrenzt einsetzbar. Ferner ist ihre Effizienz gering und sie erweisen sich oft als toxisch. Diese Probleme können mit den erfindungsgemäßen Konjugaten umgangen werden. Dies gilt insbesondere deshalb, da nur die nicht-toxische schwere Kette des Toxins verwendet wird und nicht das gesamte Toxin, wie in WO 95/32738, das aus zwei Polypeptidketten (leichte Kette und schwere Kette) aufgebaut ist. Das Toxin der Gattung Clostridium wurde erfindungsgemäß so modifiziert, daß die toxische leichte Kette des Moleküls eliminiert wurde bzw. durch eine Domäne ersetzt wurde, die eine Affinität für die in neuronale Zellen einzubringenden Substanzen verleiht. Von den Erfindern wurde herausgefunden, daß Konjugate, die nur die schwere Kette eines Clostridium-Toxins enthalten, die oben genannte Aufgabe lösen, da die Funktionen der neurospezifischen Bindung und Aufnahme, sowie des Transports und der Freisetzung in das Zytoplasma alle in der Sequenz der schweren Kette kodiert sind. Letzteres ist ein wichtiger Voretel der schweren Kette gegenüber dem C-Fragment.

Der Ausdruck "Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen" weist darauf hin, daß die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium Zellpermeabilität an Wirkstoffe jeglicher Art und Abstammung vermitteln kann. Die Wirkstoffe können z.B. (Poly)peptide, Proteine, Nukleinsäuren oder chemische Verbindungen sein. Beispiele von Polypeptiden sind Struktur-Polypeptide, Tumornekrosefaktor, Interferone, Interleukine, Lymphokine, Wachstumsfaktoren, Plasmaproteine, z.B. Gerinnungsfaktoren und Stoffwechselenzyme, und Rezeptoren. Insbesondere können die Polypeptide solche sein, welche die Immunogenität von Zellen steigern können. Dies können Polypeptide sein, die Tumorzellen fehlen, z.B. Zytokine, wie IL-2, und GM-CSF, und kostimulatorische Moleküle, wie B7-1,

tumorassoziierte Antigene, z.B. MAG1, Tyrosinasen und virale Polypeptide, z.B. E7 von humanem Papillomvirus und EBNA-3-Polypeptid von Epstein-Barr-Virus. Ferner können die Polypeptide Adapter-Polypeptide, Oligomerisierungsmotive eines Polypeptids, Polypeptidfragmente von Virus-Hüllpolypeptiden, Hormone und Ribozyme sein. Beispiele von Nukleinsäuren sind solche, die für vorstehende Polypeptide kodieren. Ferner können es Antisense-Oligonukleotide (insbesondere zur Inhibierung von MYC N bei der Behandlung von Neuroblastoma-Tumoren), Peptid-Nukleinsäuren und Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren sein. Beispiele von chemischen Verbindungen sind Arzneimittel, die keine Polypeptid-Struktur aufweisen. Solche können Cytostatika, Anästhetika, Antihistaminika, Antibiotika, photoaktive Substanzen, radioaktive Substanzen, zur Fluoreszenz-fähige Substanzen oder Substanzen für die Fluor-Kernspinspektroskopie. Beispiele der Chemotherapeutika sind Virustatika, Antiprotozoenmittel, Zytostatika und Antibiotika. Vertreter dieser sind z.B. Doxorubicin, Daunorubicin, Tetracycline, Antimetaboliten, wie Methotrexat, und Derivate davon. Beispiele der photoaktiven Substanzen sind Porphyrine, wie o-, m- und/oder p-Tetracarboxyphenylporphyrin (TCPP), Chlorine und Bakteriochlorine. Ein Beispiel der radioaktiven Substanz ist ein mit radioaktivem Jod markiertes Tyrosin. Beispiele der zur Fluoreszenz-fähigen Substanzen sind Fluoreszenzfarbstoffe, wie Fluorescein, Aminofluorescein (AF1), sowie Derivate und Analoga davon. Beispiele der Substanzen für die Fluor-Kernspinspektroskopie sind Polyfluorcarbonsäuren, wie Trifluoressigsäure.

Von vorstehenden Wirkstoffen können einer oder mehrere im erfindungsgemäßen Konjugat vorliegen. Bei mehreren können diese gleich oder verschieden voneinander sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die schwere Ketten eines Toxins der Gattung Clostridium über einen Linker mit dem Wirkstoff verbunden. Die Konjugation mit der schweren Kette kann dabei prinzipiell auf zwei Wegen erreicht werden:

- a) Der zu koppelnder Wirkstoff wird mit einem aminoreaktiven, bispezifischen Crosslinker modifiziert und dabei aktiviert. Nachfolgend reagiert diese modifizierte Molekül über eine aktivierte Disulfidbrücke, die vom Linker stammt, mit der freien SH-Gruppe der schweren Kette und bildet eine kovalente Disulfidbrücke. Dafür geeignete Crosslinker sind SPDP, LC-SPDP oder Sulfo-LC-SPDP; SMPT oder Sulfo-LC-SMPT; SMCC oder Sulfo-SMCC; MBS oder Sulfo-MBS, SIAB oder Sulfo-SIAB, SMPB oder Sulfo-SMPB; GMBS oder Sulfo-GMBS, SIAX oder SIAXX; SIAC oder SIACC, NP1A (alle Fa. Pierce, Rockford, USA)
- b) Die schwere Kette wird durch einen Crosslinker aktiviert, der dann eine Bindung an einen Wirkstoff gewährleistet. Beispielsweise kann die schwere Kette mit NHS-SS-Biotin umgesetzt werden, dann Bindung über Biotin an Avidin oder Streptavidin. Weitere dafür geeignete Linker sind D-Biotin oder Biocytin; NHS-Biotin oder Sulfo-NHS-Biotin, NHS-LC-Biotin oder Sulfo-NHS-LC-Biotin; NHS-Iminobiotin; Sulfo-NHS-SS-Biotin; Biotin-BMCC; Biotin-HPDP; Iodoacetyl-LC-Biotin; Biotin-Hydrazid oder Biotin-LC-Hydrazid, Biocytin-Hydrazid, 5-(Biotinamido)-pentylamin (alle Fa. Pierce, Rockford, USA). Weitere dem Fachmann bekannte Linker können ebenfalls verwedet werden. Der Linker kann am N-Terminus, am C-Terminus, an primären Aminogruppen oder SH-Gruppen vorliegen, wobei auch in der Mitte des Moleküls liegende Aminosäuren modifiziert werden können. Mit der Einstellung des pH-Wertes bei der Reaktion kann die Reaktion so gesteuert werden, daß bevorzugt am N-Terminus modifiziert wird. Aber auch Lysin-Reste sind reaktiv, besonders bei hohem pH-Wert. Gerade im Fall der gewünschten Bindung eines Proteins, Peptids oder Ribozyms als Wirkstoff hat es sich bewährt, die Kopplung an die schwere Kette des Clostridium-Toxins mittels eines chemischen Crosslinkers durchzuführen. Das Vorgehen ist dabei beispielsweise wie folgt. Von einem Toxin, bevorzugt Tetanustoxin (Clostridium tetani), wird die schwere Kette mittels isoelektrischer Fokussierung von der leichten Kette abgetrennt (Weller et al., Eur. J. Biochem. 182, S. 649-656 (1989)), wobei sie und in einer harnstoffhaltigen Lösung (z.B. 2 M Harnstoff, 50 mM DTT) vorliegt. Um wieder zu der

natürlichen Konformation zu kommen, wird diese Lösung gegen einen physiologischen Puffer dialysiert. Dabei kommt es spontan zur nativen Disulfidbrückenbildung im C-terminalen Teil, und die Cystein-Gruppe, welche normalerweise die Bindung zur leichten Kette bildet, liegt exponiert am N-Terminus der schweren Kette vor. Um dort die gewünschte Disulfid-Bindung zu erreichen, kann ein bispezifischer Crosslinker, wie Sulfo-LC-SPDP (Fa. Pierce, USA), eingesetzt werden. Im Prinzip läuft die Reaktion so, daß zunächst die zu koppelnde Substanz über eine primäre Aminogruppe mit der NHS-Gruppe des Linkers reagiert und eine stabile Amidbindung erzeugt. Im zweiten Schritt wird das entstandene Konstrukt mit der schweren Kette des Toxins umgesetzt. Dabei erfolgt ein Disulfidaustausch zwischen dem Linker und der SH-Gruppe der schweren Kette des Toxins. Es entsteht dabei eine stabile Disulfidbrücke, die die zu koppelnde Substanz mit der schweren Kette des Toxins verbindet.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform liegt die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium in Form eines Fusionspolypeptids vor. Der Ausdruck "schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium" umfaßt daher auch ein Fusionspolypeptid bzw. -protein, in dem die schwere Kette des Toxins als durchgängiges Polypeptid oder Protein mit einem anderen Polypeptid oder Protein rekombinant hergestellt worden ist. Dieses andere Peptid oder Protein soll der schweren Kette des Toxins bindende Eigenschaften für obige Substanzen verleihen, wobei die Bindung (z.B. im Falle von Nukleinsäuren) über ionische Wechselwirkungen stattfindet. Diese Peptide oder Proteine, die dem Toxin bindende Eigenschaften verleihen, sind insbesondere basische Proteine, wie z.B. das HMG (High Mobility Group)-1 Protein, Histon-Proteine, Protamin, Spermidin oder Polypeptide mit speziellen DNA-Bindemotive, wie z.B. Helix-turn-Helix, Zink-Finger oder Leucin-Zipper.

Eine weitere Möglichkeit, insbesondere zur Anknüpfung von Nukleinsäuren an die schwere Kette, ist die Kopplung eines Oligonukleotids (z.B. über Crosslinker), wobei dieses

Oligonukleotid in der Lage ist, mit speziellen Nukleinsäure-Sequenzen, z.B. auf einem Plasmid, eine sog. Triplehelix zu bilden. Damit werden die Nukleinsäuren über Wasserstoffbrücken mit dem Oligonukleotid an die schwere Kette gebunden. Der Vorteil ist, daß diese Bindung unter physiologischen Bedingungen stabiler ist als ionische Wechselwirkungen.

Die Vermittlung von Zellpermeabilität an Wirkstoffe kann durch übliche Verfahren nachgewiesen werden. Günstig ist es, Zellen mit den Toxin-verbundenen Substanzen zu inkubieren und das Eindringen bzw. Vorliegen der schweren Kette eines Clostridium-Toxins und/oder den Substanzen in den Zellen nachzuweisen. Dies kann z.B. durch spezifische Antikörper (z.B. im Rahmen der Immunfluoreszenz-Methode) oder Reagentien erfolgen, die direkt oder indirekt mit der schweren Kette eines Clostridium-Toxins bzw. den Substanzen reagieren.

Die schwere Kette des Clostridium-Toxins muß vor ihrer Konjugation an die therapeutischen oder diagnostischen Wirkstoffe von der leichten Kette abgetrennt werden. Die Herstellung der schweren Kette erfolgt bevorzugt rekombinant, kann aber auch auf anderen dem Fachmann bekannten Wegen erfolgen.

Ein Weg, den die Verwendung der schweren Kette bietet, ist die native Komposition des Toxins möglichst identisch nachzuahmen, um ein Konstrukt herzustellen, das alle Funktionen des Toxin-Proteins mit Ausnahme der toxischen Eigenschaften besitzt. Dazu wird die leichte Kette des Toxins bevorzugt durch andere Proteine oder Substanzen ersetzt, die wie im nativen Toxin über eine Disulfidbrücke an die schwere Kette gebunden werden.

Nukleinsäuren, wie anti-sense Oligonukleotide, werden bevorzugt an ein Fusionsprotein der schweren Kette eines Clostridium-Toxins gekoppelt. Dies ist ausführlich einem der nachfolgenden Beispiele beschrieben. Solche Konstrukte eignen sich bestens für gentherapeutische Zwecke, z.B. zur Behandlung von

Neuroblastoma-Tumoren, wenn das anti-sense Oligonukleotid z.B. die Expression von MYC N hemmt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium
- (b) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es Zellpermeabilität für neuronale Zellen an Substanzen jeglicher Art und Abstammung zu vermitteln. Auch können die Zellen ex vivo bzw. in vivo vorliegen. Desweiteren löst die Zellpermeabilität keine toxischen Effekte aus.

Die vorliegende Erfindung eignet sich somit bestens für Diagnose und Therapie. Letzteres umfaßt das Eingreifen in die Expression von Genen und in Stoffwechselprozesse. Besonders eignet sich die vorliegende Erfindung für die Diagnose und Therapie schwerster Erkrankungen, z.B. von Tumoren. Ganz besonders zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie sowohl für konservative als auch gentherapeutische Behandlungsmaßnahmen eingesetzt werden kann.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Figuren beschrieben.

- Fig. 1: Aufnahme von Konjugaten in Neuroblastom-Zellen
- A1: Dapi-Zellkernfärbung der HDN-16 Zellen von Bild A2
 - A2: Avidin-Signale von HDN-16 Zellen, die mit einem Konjugat aus der schweren Kette des Tetanus-Toxin und Avidin inkubiert wurden.

Der Avidin-Nachweis erfolgte durch einen FITC-markierten Sekundärantikörper, der einen spezifischen Avidin-Antikörper erkennt.

- B1: Propidiumjodid-Zellkernfärbung der Kelly-Zellen von Bild B2.
B2: FITC-Signal von Oligonukleotiden, die mit einem Konjugat aus der schweren Kette des Tetanus-Toxin, Avidin und biotinylierten Oligonukleotiden (FITC-markiert) inkubiert wurden.

Fig. 2: Nachweis der Aufnahme des full-length-Fusionsproteins aus dem verkürzten HMG-1-Protein und der schweren Kette des Tetanus-Toxin in die Neuroblastom-Zelllinie IMR-32

- A: Dapi-Zellkernfärbung der Zellen von Bild B
B: Nachweis des Fusionsproteins über einen polyklonalen AK gegen das C-Fragment der schweren Kette des Tetanus-Toxin und einen CY-2 markierten Sekundärantikörper

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beispiele beschrieben. Die Arbeitsmethoden basieren auf Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, und Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1994-1998.

Beispiel 1: Isolation und Klonierung des Gens der schweren Kette des TetanusToxins aus Clostridium tetani

Als Ausgangsmaterial wurde ein lyophilisiertes Bakteriensediment von Clostridium tetani (Massachusetts-Stamm), das von ATCC unter der Nummer ATCC 10709 bezogen wurde, verwendet. Nach der DNA-Extraktion war es das Ziel, mittels der Pfu-Polymerase und nachfolgenden Primern, welche die Restriktionsstellen für die Klonierung einführten, das etwa 2,5 kb große Gen der schweren Kette ohne Mutationen zu

amplifizieren. Dazu wurden folgende Parameter gewählt: große Menge von Ausgangs-DNA (0,5 µg), große Menge Polymerase (10 U), lange Extensionszeiten für die "proof-reading" Funktion der Polymerase (7 min für das 2,5 kb-Gen), geringe Anzahl von Zyklen (5 Zyklen bei 54°C, da in den ersten Zyklen die Restriktionsstellen nicht komplementär sind, dann 15 Zyklen bei 60°C):

PCR-Ansatz: 0,5 µg DNA
25 pmol Klonierungsprimer 1
25 pmol Klonierungsprimer 2
5 µl 10 x Pfu-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,8
20 mM MgSO₄,
100 mM KCl
100 mM (NH₄)₂SO₄,
1% Triton
1 mg/ml BSA)
10 µl dNTP-Mix
10 U Pfu-Polymerase
ad 50 µl H₂O

Klonierungsprimer 1: HCH.FOR
GCATATCCATGGATTAGGAGGAGAATTATGTATATAA
NcoI

Klonierungsprimer 2: HCH.REV
TATATACCCGGGATCATTTGTCCATCCTTCATCTGT
SmaI

Unter den oben genannten PCR-Bedingungen war es möglich, das erwartete 2,5 kb-Fragment ohne Nebenprodukte zu bilden. Nach einer präparativen Agarosegelelektrophorese mit nachfolgender Gelextraktion wurde das DNA-Fragment mit NcoI und SmaI geschnitten und in den gemäß Herstellerangaben vorbereiteten Expressionsvektor pCYB4 (IMPACT-System, New England Biolabs, Beverly, USA) kloniert. Der erhaltene Vektor wurde pCYB4-HCH genannt. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Klonierungstechnisch bedingt hatte das rekombinante Protein am C-Terminus zusätzlich die Aminosäuren Glycin und Prolin vor der Intein-Spaltstelle. Am Amino-Terminus war es um drei Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp-Protein verkürzt. Somit

war die erste Aminosäure des rekombinanten Proteins nach dem Formyl-Methionin ein Aspartat. Diese Aminosäure kann in eukaryotischen Zellen für eine Destabilisierung des Proteins sorgen, indem es einen raschen Abbau induziert. Um sicherzustellen, daß die rekombinante schwere Kette nach der Aufnahme von humanen Zellen stabil ist, wurde der Amino-Terminus komplettiert. Dazu wurde über eine NcoI und BseRI Schnittstelle ein Oligoadapter in pCYB4-HCH eingeführt, der für die drei fehlenden aminoterminalen Aminosäuren codiert. Somit bestand die erste Aminosäure nun in einem Serin, die stabilisierend für das Protein ist. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung verifiziert.

AD-A 5'-CATGTCATTAACAGATTTAGGAGGAGAATTATGTAT-3'
AD-B 3-AGTAATTGTCTAAATCCTCCTCTTAATACA-5'
neu: Ser Leu Thr
alt: Asp Leu...

Das neue Konstrukt wurde pCYB4-Ad-A+B-HCH genannt.

Als weiteres Expressionssystem wurde das IMPACT T7 System (New England Biolabs, Beverly, USA) eingesetzt. Dieses nutzt im Unterschied zum ursprünglichen System die T7-Polymerase zur Transkription der Expressions-Plasmid. Da auch mit diesem System eine zusätzliche Reinigung über eine N-Terminale His-tag ermöglicht werden sollte, wurde ein entsprechender Adapter in das Expressions-Plasmid pTYB1 kloniert. Der Vektor wurde mit NdeI und XhoI verdaut und der Adapter I + II ligiert.

Ad-I 5'-TATGCACCATCACCATCACCATC-3'
Ad-II 3'-ACGTGGTAGTGGTAGTGGTAGAGCT-5'
His His His His His His Leu Glu

Die Klonierung wurde durch Sequenzierung verifiziert. Das Konstrukt wurde pTYB1-Ad-I+II genannt.

Das Plasmid pTYB1-Ad-I+II wurde mit SapI veraut, die überhängenden Basen mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und der

Vektor nochmals mit XhoI verdaut.

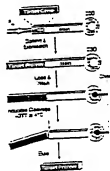
Ausgehend von dem Plasmid pCYB4-Ad-A+B-HCH mit dem kompletten Gen der schweren Kette, wurde für die Klonierung eine PCR mit der Pfu-Polymerase durchgeführt. Damit wurde das Gen der schweren Kette amplifiziert, das am 5'-Ende eine XhoI-Schnittstelle hatte und am 3'-Ende das Codon für Aspartat (letzte Aminosäure wt schwere Kette) mit dem Codon für Serin ausgetauscht hatte. Dieser Aminosäureaustausch war nötig geworden, da Aspartat eine totale in vivo-Spaltung des HCH-Intein-Fusionsprotein bewirkt hätte (Manual IMPACT-System). Das PCR-Produkt wurde, nach XhoI-Verdau in den vorbereiteten Vektor pTYB1-Ad-I+II sticky/blunt ligiert. Durch diese Strategie wurde das Gen für die schwere Kette ohne zusätzliche Aminosäure am C-Terminus direkt vor die erste Aminosäure des Inteins kloniert.

Das Konstrukt wurde pTYB1-HCH genannt.

1. Primer: XhoHCH.FOR TATATACTCGAGTCATTAAACAGATTAGGA
GGAGAATT
2. Primer: BluntHCH-A.REV GCTATTTGTCCATCCTTCATCTGTAGGTA-
CAAAGTA

PCR-Parameter

5 min 95°C
25 Zyklen 1 min 95°C
1 min 55°C
7,5 min 72°C
10 min 72°C, dann 4°C



Prinzip des IMPACT-Systems

Beispiel 2: Expression und Reinigung der schweren Kette des Tetanus-Toxins in E.coli

Aus einer E.coli K12 Bakterienkultur vom pTYB1-HCH wurde eine 200 ml LB-Amp-Übernachtskultur angeimpft. Diese wurde am nächsten Tag zu 800 ml LB-Amp gegeben und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bis 1,5 geschüttelt. Von diesen Bakterien wurden 50 ml als uninduzierte Probe entnommen und sedimentiert. Zu dem restlichen Ansatz wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM gegeben und die Bakterien bei Raumtemperatur für 4-5 Stunden geschüttelt. Nach der Induktionszeit wurden die Bakterien sedimentiert und konnten bei -20°C gelagert werden. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt.

Die Sedimente, die einer Bakteriensuspension von ca. 250 ml entsprachen, wurden mit 6,25 ml Lysepuffer (20 mM HEPES, pH 8,0 ggf. 2M Harnstoff 500 µM EDTA 0,1 % Triton X-100) resuspendiert. Zur Verhinderung von proteolytischem Abbau wurde COMPLETE-Proteinase Inhibitor (Fa. Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers zugegeben. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Ultraschall (Branson-Sonifier 250; 5x1 min, 20 % Leistung, mit jeweils 30 sec Pause). Nach der anschließenden Zentrifugation für 30 min bei 12000 g wurde der Überstand auf eine mit Lysepuffer äquilibrierte Chitin-Säule gegeben. Der Durchfluß wurde aufgefangen und nochmals über die Säule gegeben. Der erste Waschschrift mit dem 4-fach Säulenvolumen erfolgte mit dem Lysepuffer. Es schlossen sich ein Waschschrift mit dem Waschpuffer 1 (20 mM HEPES, pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 % Triton X-100) (8-faches Säulenvolumen) und Waschpuffer 2 (50 mM BICINE, pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) (4-faches Säulenvolumen) an. Zur Induktion der Proteinspaltung wurden 3 Säulenvolumen Cleavage Puffer (50 mM BICINE, pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA, 30 mM β-Mercaptoethanol) über die Säule gegeben und diese dann über Nacht verschlossen. Die Elution erfolgte mit dem Waschpuffer 2 und die Proteinkonzentration wurde mittels des BioRad Detektionssystems bestimmt.

Nach der oben beschriebenen C-terminalen Reinigung der rekombinanten Proteine eluierten Produkte mit heterogener Größe. Als weiteren Reinigungsschritt sollte deshalb das full length Protein, das 6 Histidine am N-Terminus besaß, über eine Ni-Agarose Affinitätsmatrix homogen isoliert werden.

Die Ni-Agarose-Suspension wurde mit dem Waschpuffer 2 (4 M Harnstoff, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, pH 6,3) äquilibriert. Die Proteinlösung wurde durch das Zugabe des gleichen Volumens von Waschpuffer 1 (8 M Harnstoff, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, pH 6,3) auf eine Harnstoffkonzentration von 4 M eingestellt. Nach Zugabe der Ni-Beads wurde die Suspension in einem Reaktionsgefäß auf einem Taumelrollenmischer bei 4°C für 30-60 min inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine leere Säule gefüllt, die durch eine Fritte die Beads zurückhielt. Ungebundene Proteine wurden mit dem 10-fachen Säulenbettvolumen an Waschpuffer 2 entfernt. Vor der Elution wurde der Harnstoff durch den Waschpuffer 3 (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0, 150 mM NaCl) entfernt und der pH auf 8,0 eingestellt. Die gebundenen Proteine wurden durch den Elutionspuffer freigesetzt und aufgefangen.

Beispiel 3: Expression und Reinigung eines Fusionsproteins aus dem HMG-1-Gen und dem Gen der schweren Kette des Tetanus-Toxins

Ein weiteres Ziel war es, das Gen der schweren Kette des Tetanus-Toxins mit einem anderen Gen zu kombinieren, um ein Fusionsprotein mit neuen Eigenschaften zu erhalten. Die Funktionen der schweren Kette, die die zelltypspezifische Bindung, Aufnahme und Freisetzung des Toxins umfassen, sollten durch eine DNA-Bindedomäne ergänzt werden. Zu diesem Zweck wurde das humane Chromatinprotein HMG-1 kloniert.

Die Bezeichnung HMG steht für High Mobility Group und bezieht sich auf das Laufverhalten der Proteine bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Proteine gehören zum nicht-Histon-

Anteil des Chromatins und werden in drei Familien eingeteilt: 1. HMG-1/2; 2. HMG-14/17; 3. HMG-I(Y). HMG-1/2-Proteine werden in allen Zellen exprimiert, ihre genaue Funktion ist allerdings nicht bekannt. Das Molekulargewicht beträgt etwa 25 kDa. Es handelt sich, ähnlich wie bei den Histonen, um Proteine mit stark konservierter Sequenz. So beträgt die Homologie zwischen dem HMG-T der Forelle und dem humanen HMG-1 noch 70%. Charakteristisch für das HMG-1-Protein sind die zwei sogenannten HMG-Boxen A und B, die homolog zu anderen HMG-Proteinen sind. Diese Boxen liegen im N-terminalen Bereich, haben eine Nettoladung von +20 und bewirken eine unspezifische DNA-Bindung. Die Bindung umfaßt ca. 14 bp, wobei die DNA gebogen wird. Im Gegensatz zu den HMG-Boxen ist der C-Terminus negativ geladen, so daß die Gesamtladung bei -5 liegt.

Mittels Datenbankrecherche wurde ein IMAGE-Klon identifiziert, der das gewünschte Gen enthielt. Von dem Ressourcenzentrum Berlin (MPI für Molekulare Genetik) wurde der Klon p998B091570 (clone ID 645032) geliefert.

Mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern, die am 5'-Ende eine NcoI- bzw. SmaI-Schnittstelle besaßen, wurde das Gen mit der Pfu-Polymerase amplifiziert.

Ansatz: s. Beispiel 1

Klonierungsprimer 1: HMG-1.FOR
GCATATCCCATGGGCAAAGGAGATCCCTAAGAA
NcoI

Klonierungsprimer 2: HMG-1a.REV
TATATAGGGGCCCTTCATCATCATCTTCTTC
SmaI

PCR-Parameter 5 min 95°C
 5 Zyklen 1 min 95°C
 1 min 56°C
 7 min 72°C
 15 Zyklen 1 min 95°C
 1 min 62°C
 7 min 72°C
 10 min 72°C, dann 4°C

Das Plasmid pCYB4-HCH (s. Bsp. 1) wurde mit NcoI und BseRI verdaut und der Adapter Ad X+Y eingefügt. Dieser Adapter ermöglichte es, das mit NcoI und SmaI verdaute HMG-1 PCR-Fragment über NcoI und SnaBI (ebenso wie SmaI blunt) in frame vor das Gen der schweren Kette zu ligieren. Ebenso wurde durch den Adapter das 5'-Ende der schweren Kette komplettiert und ein Peptidlinker zwischen den beiden Proteinen eingefügt. Der Peptidlinker hatte folgende Sequenz: Val-Lys-Ser-Ala-Pro-Ser-Gly.

Ad-X

5'-CATGGGCGGCGCTACGTAAGAGCGCTCCCTCGGGTCATTAACAGA-TTTAGGAGGAGAATTATGTAT-3'

Ad-Y

3-CCGCCGGCGCATGCATTTCTCGCGAGGGAGCCCCAG-TAATTGTCTAAATCCTCTTAATACA-5'

Alle Klonierungen wurden durch Sequenzierung verifiziert. Der Vektor mit dem inserierten Adapter wurde pCYB4-Ad-X+Y-HCH und der Vektor mit dem inserierten HMG-1-Gen pCYB4-HMG-1-HCH genannt. Da das HMG-1 PCR-Fragment vor der Ligation auch mit SmaI verdaut und blunt an den Adapter ligiert wurde, hatte das HMG-1-Protein am C-Terminus zusätzlich noch die Aminosäure Glycin (Codon: GGG). Somit besaß das Fusionsprotein die folgende schematische Sequenz: ATG-wt HMG1-Gly-Val-Lys-Ser-Ala-Pro-Ser-Gly-wt schwere Kette Tetanustoxin-Gly-Pro-Intein-Chitin-Bindeprotein.

Da bei allen Isolaten neben dem Produkt mit der korrekten Größe auch kleinere Fragmente eluiert wurden, sollte der Expressionsvektor derart verändert werden, daß die rekombinanten Proteine zusätzlich über den N-Terminus gereinigt werden konnten. Dazu wurde, ausgehend von dem Vektor pCYB4-Ad-X+Y-HCH, ein Adapter einligiert, der nach dem Startcodon für sechs Histidine codiert und somit eine Reinigung über Metall-Affinitäts-Säulen ermöglichte. Nach den His-Codons befand sich eine XhoI-Schnittstelle. Nach Verdau

mit XhoI und SnaBI konnten somit weitere Gene in frame integriert werden. Der Vektor wurde mit NcoI und SnaBI verdaut und der Adapter sticky/blunt unter Rekonstitution der SnaBI (blunt)-Schnittstelle ligiert.

Ad-HIS-A 5'-CATGCACCATCACCATCACCATCTCGAGGGTGGATAC-3'

Ad-HIS-B 3'-GTGGTAGTCGGTAGGTAGAGCTCCACCTATG-5'

His His His His His His Leu Glu Gly Gly Tyr

Die Klonierung wurde durch Sequenzierung verifiziert. Dieses Konstrukt wurde pCYB4-HIS-HCH genannt. Auch eine Reinigung der rekombinanten schweren Kette über die His-Tag war mit diesem Plasmid möglich. Dieses Protein hatte zusätzlich zur Wildtyp-Sequenz 18 Aminosäuren am N-Terminus (6xHis-Leu-Glu-Gly-Gly-Tyr-Val-Lys-Ser-Ala-Pro-Ser-Gly).

Zur Konstruktion von HMG-1/schwere Kette-Fusionsproteinen, die zusätzlich über eine aminoterminal His-Tag gereinigt werden können, wurden das HMG-1 Gen mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert, die am 5'-Ende eine XhoI-Schnittstelle einführten. Die Prüfer am 3'-Ende des Gens waren komplett komplementär, so daß eine sticky/blunt-Ligation durchgeführt werden konnte. Als weitere Variation wurde ein am 3'Ende verkürztes Fragment des HMG-1-Gens kloniert, welches nur die DNA-bindenden Domänen (HMG-Box A + B) enthielt. Die PCR wurde mit der Pfu-Polymerase und dem Klon pCYB4-HMG-1-HCH als Matrize durchgeführt.

Primer für komplettes HMG-1-Gen:

XhoHMG-1.FOR
XhoHMG-1.REV

GCATACTCGAGGGGAAAGGAGATCCTAAGAAGCC
TTCATCATCATCATCTTCTTCTTCATCTTCAT

Primer für verkürztes HMG-1-Gen:

XhoHMG-1.FOR
DeltaHMG-1.REV

GCATATCTCGAGGGGAAAGGAGATCCTAAGAAGCC
AGCTCGATATGCAGCTATATCCTTTTC

PCR-Parameter

5 min 95°C

25 Zyklen 1 min 95°C
1 min 55°C
1,5 min 72°C
10 min 72°C, dann 4°C

Das Plasmid pCYB4-HIS-HCH wurde mit XhoI und SnaBI verdaut und die PCR-Fragmente nach XhoI-Verdau einligiert. Die Konstrukte wurden pCYB4-His-HMG-1-HCH bzw. pCYB4-His-ΔHMG-1-HCH genannt. Die Klonierungen wurden durch Sequenzierung verifiziert.

Die Herstellung des Fusionsproteins erfolgte mit pCYB4-His-HMG-1-HCH bzw. pCYB4-His-ΔHMG-1-HCH analog Beispiel 2 rekombinant in *E. coli*.

Beispiel 4: Aufnahme von Proteinkonjugaten in Neuroblastom-Zellen

Der bispezifische Crosslinker Sulfo-LC-SPDP (Fa. Pierce, Rockford, USA) besitzt eine Amino- und eine SH-reaktive Gruppe.

Das Protein neutrAvidin (Fa. Pierce, USA) lag in einer Konzentration von 5 mg/ml in 50 mM BICINE (Fa. Sigma), pH 8,5; 80 mM NaCl vor. Es handelte sich hierbei im Gegensatz zum Wildtyp um ein Protein ohne Zuckerseitenketten und damit mit neutralem pI-Wert. Dies verhindert die unspezifischen Wechselwirkungen z.B. mit Zellen, die bei dem basischen Wildtyp-Protein vorkommen. Der Crosslinker war in einer Konzentration von 15 mM in DMSO gelöst (Lagerung bei -80°C). 2,5 mg Avidin wurden mit einem dreifachen molaren Überschuss des Crosslinkers für zwei Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Tris-Puffer pH 8,0 gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde durch eine Gelfiltration über eine G-25 Entsalzungssäule (FPLC) in 50 mM MOPS pH 7,4; 80 mM NaCl überführt und dabei die überschüssigen Crosslinker entfernt. Nach Angaben des Herstellers wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit I (Bio-Rad, München) die Proteinkonzentration der Säulenfraktionen bestimmt und

anschließend durch Reduktion eines Teils des modifizierten Proteins die Anzahl der gekoppelten Linker pro Molekül gemäß Standardmethoden photometrisch bestimmt. Es ergab sich eine Anzahl von 1,9 Linkern pro Avidin-Molekül.

Zunächst wurden die beiden Proteine gekoppelt, um eine Einschleusung von Avidin in Neuroblastom-Zellen über die schwere Kette nachzuweisen. Dazu wurde 1 nmol (= 60 µg) des modifizierten Avidins mit 192 pmol (= 19,2 µg) der schweren Kette von Tetanustoxin in 50 mM MOPS-Puffer, pH 7,4 und 80 mM NaCl bei 4°C für 3 Tage inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde über eine Superdex-200-Gelfiltrationssäule, die mit 50 mM CHES pH 9,5 und 1,5 M NaCl äquilibriert war, aufgetrennt. 100 µl Proben aus den ersten Peakfraktionen wurden für Immunfluoreszenz-Experimente verwendet.

Für diesen Versuch wurde die Neuroblastom-Zelllinie HDN-16 vorbereitet. Die Zellen waren am Vortag des Experiments auf unbeschichtete Glas-Deckgläschen (Ø = 1 cm) ausgesäht und in 6-Loch-Gefäße (Ø je Loch = 3,5 cm) mit je 4 ml Medium überschichtet worden. Vor Beginn des Experiments wurden die Zellen mit Medium gewaschen, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nachfolgend wurden die Zellen zu 100 µl Elutionsfraktion in 1 ml RPMI-Medium (+ 10% FCS) gegeben und für 5 h ohne Bewegung inkubiert. Alle Schritte der Immunfluoreszenz wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen ausgiebig mit Medium gewaschen und direkt danach fixiert.

Sowohl die Erst- (anti-Avidin, Kaninchen, 2 µg/ml; Rockland, Gilbertsville, USA) als auch die Zweitantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-CY-2; 3,3 µg/ml; Rockland, Gilbertsville, USA) wurden mit der Verdünnungslösung (PBS, 0,1% BSA) angesetzt.

Das Volumen betrug 50 µl. Diese Lösung wurde in einem 6-Loch-Gefäß vorgelegt und die Deckgläschen mit der Zellseite darauf gelegt. Die Inkubationszeit betrug mindestens 30 min,

anschließend wurden die Zellen mit PBS ausgiebig gewaschen.

Zur Färbung des Zellkerns wurden die Zellen für 10 min mit einer Dapi-Lösung (5 ng/ml in 2 x SSC) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Auf einen Objektträger wurden 15 µl des Mounting-Mediums (2,4 g Mowiol in 6 ml Glycerin, 1 h Rühren, + 6 ml H₂O, 2 h Rühren + 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5, 50°C mit gelegentlichem Rühren, Zentrifugation: 5000 g für 15 min, Zugabe von 23 mg/ml DABCO; Lagerung von 1 ml Portionen bei -20°C) vorgelegt und die Deckgläschen mit der Zellseite unter Vermeidung von Luftblasen langsam aufgelegt. Die Objektträger wurden waagrecht und abgedunkelt über Nacht zum Auspolymerisieren gelagert. Das erstarrte Einbett-Medium konserviert das Präparat und das beinhaltete Dabco soll das Ausbleichen der Farbstoffe bei der Fluoreszenz-Mikroskopie verhindern. Die Präparate konnten bei 4°C über mehrere Wochen gelagert werden.

Die Präparate wurden mit einem Zeiss Axiophot Epifluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Die Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera CH250 der Firma Photometrics (München) gemacht und mit der Bildverarbeitungs-Software IPLab-Spectrum 10 (Vers. 3.0) dokumentiert.

In Fig. 1 sind die deutlichen Avidin-Signale zu sehen. Kontrollansätze mit a) Avidin, b) der schweren Kette und c) einem Ansatz mit unmodifizierten Avidin und der schweren Kette in der Konzentration der Elutionsfraktion, erbrachten keine Signale (Daten nicht gezeigt).

Durch dieses Experimentieren wurde der Nachweis erbracht, daß es mit der schweren Kette des Tetanus-Toxins möglich ist, andere Proteine in Neublastrom-Zellen zu transportieren.

Beispiel 5: Bindung von Biotin-Oligonukleotiden an das schwere Ketten-Avidin-Konjugat

In weiteren Ansätzen sollte die schwere Kette mit dem modifizierten Avidin gekoppelt werden, um dann an diese Konjugate DNA-Oligonukleotide (15-mer mit zufälliger Sequenz, Fa. MWG Biotech, München) zu binden. Dazu wurde 1 nmol (= 100 µg) der schweren Kette von Tetanustoxin mit 500 pmol (= 30 µg) des modifizierten Avidins (neutrAvidin, Fa. Pierce, Rockford, USA) in 50 mM Hepes pH 8,5 und 150 mM NaCl für 6 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden 50 pmol eines 15mer DNA-Oligonukleotids zugegeben und der Ansatz ohne Bewegung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Oligonukleotide besaßen an ihrem 3'-Ende eine Biotin-Gruppe, die eine Bindung an Avidin ermöglicht. Am 5'-Ende waren die Oligonukleotide mit einer FITC-Gruppe modifiziert, um so eine eventuelle Aufnahme in Zellen nachweisen zu können. Die Modifikationen der Oligonukleotide waren vom Hersteller bei der Synthese eingeführt worden (Fa. MWG Biotech, München).

Obwohl in den Ansätzen Avidin in einem 10fachen molaren Überschuß vorlag und theoretisch pro Avidin vier Biotin-Bindestellen zur Verfügung standen, sollten noch eventuell vorhandene freie Oligonukleotide aus den Ansätzen entfernt werden, um Versuchsartefakte zu minimieren. Dazu wurden die Ansätze entweder mit magnetischen Beads, die mit Streptavidin gekoppelt waren, inkubiert, oder über eine NickSpin Column (Pharmacia) aufgetrennt. Im ersten Fall wurden die Streptavidin-Beads mit 50 mM Hepes pH 7,4; 150 mM NaCl äquilibriert, die Ansätze zugegeben und für 15 min geschüttelt. Nach der magnetischen Separierung der Beads wurde der Ansatz entnommen. Die NickSpin Columns, die eine Sephadex G-50 Matrix besaßen, wurden mit dem gleichen Puffer äquilibriert und die Ansätze nach den Angaben des Herstellers aufgetrennt. Beide Proben wurden bei den Immunfluoreszenz-Versuchen (analog Beispiel 4) eingesetzt, zeigten aber keinen signifikanten Unterschied in dem Signalmuster (vgl. Fig. 1).

BEISPIEL 6: Aufnahme des HisAHMG-1-HCH Fusionsproteins
 in Neuroblastom-Zellen

Das homogen isolierte Fusionsprotein aus einem verkürzten HMG-1-Protein und der schweren Kette des Tetanus Toxin wurde mit der Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 inkubiert, um durch Immunfluoreszenz-Analysen die Aufnahme des Proteins zu testen. Nach einer vierstündigen Inkubation von etwa 0,5 µg des Fusionsproteins in 1,5 ml RPMI-Medium (+ 10 % FCS) wurden die Zellen ausgiebig mit Medium gewaschen, fixiert, mittels Antikörper gegen das C-Fragment des Tetanus-Toxins (1 : 100 - 1 : 300; Fa. Charles River, Southbridge, USA) und einem CY-2 markierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-CY-2; Fa Rockland, Gilbertsville, USA) das Fusionsprotein detektiert. In Fig. 2 ist das Resultat des Experiments zu sehen. Es sind sehr starke Signale in fast allen Zellen zu erkennen.

Patentansprüche

- 1) Konjugat zur Einführung von Wirkstoffen in neuronale Zellen, wobei das Konjugat die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium und mindestens einen Wirkstoff umfaßt, wobei die leichte Kette des Toxins abwesend ist.
- 2) Konjugat nach Anspruch 1, wobei das Toxin der Gattung Clostridium Tetanus-Toxin oder Botulinus-Toxin ist.
- 3) Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Wirkstoff ausgewählt ist aus (Poly)peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren oder chemische Verbindungen.
- 4) Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Wirkstoff und die schwere Kette des Toxins über einen Linker miteinander verbunden sind.
- 5) Konjugat nach Anspruch 4, wobei der Linker NHS-SS-Biotin, NHS-Iminobiotin oder Sulfo-LC-SPDP ist.
- 6) Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die schwere Kette des Toxins als Fusionsprotein vorliegt.
- 7) Konjugat nach Anspruch 6, wobei der Fusionsanteil ein basisches Protein, vorzugsweise humanes HMG-1-Protein, ist.
- 8) Verfahren zur Herstellung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1-7, wobei der Wirkstoff, die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium und ggf. ein Linker miteinander umgesetzt werden.
- 9) Kit umfassend eine oder mehrere der folgenden Komponenten:
 - (a) die schwere Kette eines Toxins der Gattung

Clostridium

(b) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

- 10) Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1-7 zur Anreicherung in neuronalen Zellen.
- 11) Verwendung des Konjugats nach Anspruch 10 zur Behandlung und/oder Therapie neuronaler Erkrankungen.
- 12) Verwendung des Konjugats nach Anspruch 10 oder 11 zur gentherapeutischen Behandlung von Neuroblastom-Tumoren.

1/2

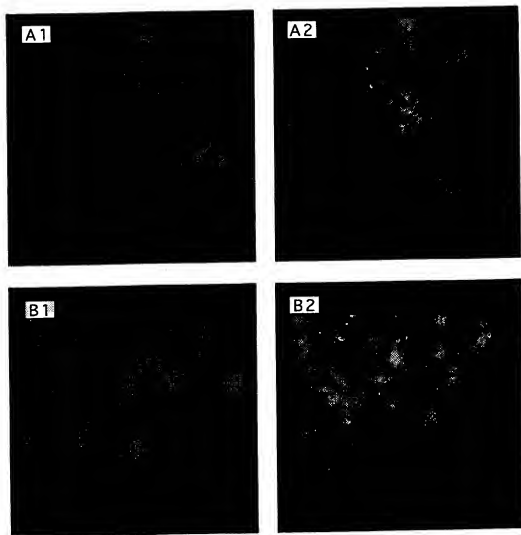


Fig. 1

2/2

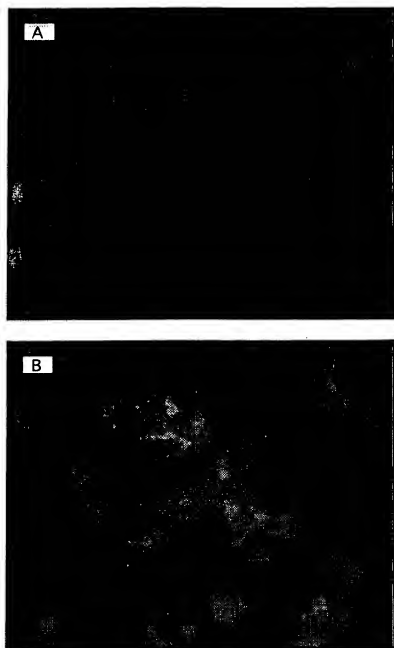


Fig. 2

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : A61K 47/48	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/33880 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Juni 2000 (15.06.00)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03924</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Dezember 1999 (03.12.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 56 052.4 4. Dezember 1998 (04.12.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖHR, Achim [DE/DE]; Hans-Thoma-Strasse 5, D-69102 Heidelberg (DE); SCHWAB, Manfred [DE/DE]; Mittlerer Rainweg 17-1d, D-69118 Heidelberg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 12. Oktober 2000 (12.10.00)</p>
<p>(54) Title: CONJUGATE USED FOR ENRICHING IN NEURONAL CELLS</p> <p>(54) Bezeichnung: KONJUGAT ZUR ANREICHERUNG IN NEURONALEN ZELLEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a conjugate for introducing active substances into neuronal cells, whereby the conjugate comprises the heavy chain of a toxin of the genus Clostridium and has at least one active substance, whereby the light chain of the toxin is absent. The invention also relates to a method for producing a conjugate of this type, to a kit and to the use of said conjugate.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat zur Einführung von Wirkstoffen in neuronale Zellen, wobei das Konjugat die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium und mindestens einen Wirkstoff umfaßt, wobei die leichte Kette des Toxins abwesend ist. Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Konjugats, einen Kit und die Verwendung des Konjugats.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabon	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritunien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/03924

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 32738 A (DOLLY JAMES OLIVER ; WHEELER LARRY ALLEN (US); ALLERGAN INC (US); A) 7 December 1995 (1995-12-07) cited in the application claims 1,2,14,15	1-12
X	WO 89 06974 A (PRAXIS BIOLOG INC) 10 August 1989 (1989-08-10) page 76, line 2 - line 9; claims 1,9,11,24-35; tables 13,14	1-12
A	US 4 594 336 A (BIZZINI BERNARD) 10 June 1986 (1986-06-10) column 6, line 8 - line 22; claims	1-12

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 June 2000

Date of mailing of the international search report

30/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentstein 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No
PCT/DE 99/03924

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 20579 A (PRICE JACK ;SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB)) 12 June 1997 (1997-06-12) page 1, line 26 - line 33	1
X	JOHNSTONE, STEPHEN R. ET AL: "The heavy chain of tetanus toxin can mediat the entry of cytotoxic gelonin into intact cells" FEBS LETT. (1990), 265(1-2), 101-3 , XP002140049	1-12
Y	the whole document	1-12
E	WO 00 28041 A (MICROBIOLOGICAL RES AUTHORITY ;HALLIS BASSAM (GB); SILMAN NIGEL (G) 18 May 2000 (2000-05-18) page 4, line 26 - line 29	1
X	FRANCIS JW ET AL: "CuZn superoxide dismutase (SOD-1): tetanus toxin fragment C hybrid protein for targeted delivery of SOD-1 to neuronal cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 270, no. 25, 23 June 1995 (1995-06-23), pages 15434-15442-15442, XP002131795 ISSN: 0021-9258 page 15434, column 2, paragraph 3	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03924

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9532738 A	07-12-1995	AU 695623 B	20-08-1998
		AU 2622295 A	21-12-1995
		CA 2191754 A	07-12-1995
		DE 69511860 D	07-10-1999
		DE 69511860 T	10-02-2000
		EP 0760681 A	12-03-1997
		ES 2138740 T	16-01-2000
		JP 10500988 T	27-01-1998
WO 8906974 A	10-08-1989	AT 109008 T	15-08-1994
		AU 634153 B	18-02-1993
		AU 3065489 A	25-08-1989
		DE 68917126 D	01-09-1994
		DE 68917126 T	02-02-1995
		DK 182990 A	31-07-1990
		EP 0399001 A	28-11-1990
		JP 2921574 B	19-07-1999
		JP 3502691 T	20-06-1991
		NO 179164 B	13-05-1996
		US 5785973 A	28-07-1998
US 4594336 A	10-06-1986	NONE	
WO 9720579 A	12-06-1997	NONE	
WO 0028041 A	18-05-2000	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inne onales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03924

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K47/48

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 95 32738 A (DOLLY JAMES OLIVER ; WHEELER LARRY ALLEN (US); ALLERGAN INC (US); A) 7. Dezember 1995 (1995-12-07) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,2,14,15	1-12
X	WO 89 06974 A (PRAXIS BIOLOG INC) 10. August 1989 (1989-08-10) Seite 76, Zeile 2 - Zeile 9; Ansprüche 1,9,11,24-35; Tabellen 13,14	1-12
A	US 4 594 336 A (BIZZINI BERNARD) 10. Juni 1986 (1986-06-10) Spalte 6, Zeile 8 - Zeile 22; Ansprüche	1-12
	— -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung beeinträchtigt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"I" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

14. Juni 2000

30/06/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentsaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inti ionales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03924

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 20579 A (PRICE JACK ;SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB)) 12. Juni 1997 (1997-06-12) Seite 1, Zeile 26 - Zeile 33	1
X	JOHNSTONE, STEPHEN R. ET AL: "The heavy chain of tetanus toxin can mediat the entry of cytotoxic gelonin into intact cells" FEBS LETT. (1990), 265(1-2), 101-3 , XP002140049	1-12
Y	das ganze Dokument	1-12
E	WO 00 28041 A (MICROBIOLOGICAL RES AUTHORITY ;HALLIS BASSAM (GB); SILMAN NIGEL (G) 18. Mai 2000 (2000-05-18) Seite 4, Zeile 26 - Zeile 29	1
X	FRANCIS JW ET AL: "CuZn superoxide dismutase (SOD-1): tetanus toxin fragment C hybrid protein for targeted delivery of SOD-1 to neuronal cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, Bd. 270, Nr. 25, 23. Juni 1995 (1995-06-23), Seiten 15434-15442-15442, XP002131795 ISSN: 0021-9258 Seite 15434, Spalte 2, Absatz 3	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte nales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03924

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9532738 A	07-12-1995	AU 695623 B	20-08-1998
		AU 2622295 A	21-12-1995
		CA 2191754 A	07-12-1995
		DE 69511860 D	07-10-1999
		DE 69511860 T	10-02-2000
		EP 0760681 A	12-03-1997
		ES 2138740 T	16-01-2000
		JP 10500988 T	27-01-1998
WO 8906974 A	10-08-1989	AT 109008 T	15-08-1994
		AU 634153 B	18-02-1993
		AU 3065489 A	25-08-1989
		DE 68917126 D	01-09-1994
		DE 68917126 T	02-02-1995
		DK 182990 A	31-07-1990
		EP 0399001 A	28-11-1990
		JP 2921574 B	19-07-1999
		JP 3502691 T	20-06-1991
		NO 179164 B	13-05-1996
		US 5785973 A	28-07-1998
US 4594336 A	10-06-1986	KEINE	
WO 9720579 A	12-06-1997	KEINE	
WO 0028041 A	18-05-2000	KEINE	